

# APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PM 258100  
(M#)

Invention: NEUE FUR DAS TAL-GEN CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZEN

Inventor (s): L. K. DUNICAN (Deceased)  
Ashling MCCORMACK  
Cliona STAPELTON  
Kevin BURKE  
Bettina MÖCKEL

Pillsbury Madison & Sutro LLP  
Intellectual Property Group  
1100 New York Avenue, NW  
Ninth Floor  
Washington, DC 20005-3918  
Attorneys  
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
  - ☒ Regular Utility Application
  - ☐ Continuing Application
  - ☐ PCT National Phase Application
  - ☐ Design Application
  - ☐ Reissue Application
  - ☐ Plant Application
  - ☐ Substitute Specification
- Sub. Spec Filed \_\_\_\_\_  
in App. No. / \_\_\_\_\_

## SPECIFICATION

## Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen

a 7 *Background of the Invention*  
*Filed of the Invention*

Gegenstand der Erfindung sind für das tal-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das tal-Gen verstärkt wird.

*2. Background Information*  
Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere aber in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure

produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei

- 5 Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in  
10 Biotechnology 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).

- Die Bedeutung des Pentosephosphat-Zyklus' für die Biosynthese und Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch coryneforme Bakterien ist Gegenstand  
15 zahlreicher Bemühungen der Fachwelt.

- So berichten Oishi und Aida (Agricultural and Biological Chemistry 29, 83-89 (1965)) über den „hexosemonophosphate shunt“ von Brevibacterium ammoniagenes. Sugimoto und Shio  
a (Agricultural and <sup>Biological</sup> Biological Chemistry 51, 101-108 (1987))  
20 berichten über die Regulation der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase in Brevibacterium flavum.

*Summary of the Invention*  
~~Aufgabe der Erfindung~~

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 5 (i) eine Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- 15 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend eine der Nukleotidsequenzen wie in SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 dargestellt,
- ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält
- 20 ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

- Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
- 25 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID NO. 1 oder

SEQ ID NO. 3 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für die Transaldolase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Transaldolase-Gens aufweisen.

10 Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für die Transaldolase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

20 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf  
Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es  
sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte  
RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,  
25 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene  
Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 ein, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Transaldolase und auch solche, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis

95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in denen die für das tal-Gen codierenden Nukleotidsequenzen, verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- 10 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken
- 15 Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art

20 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum, sind die zum Beispiel

30 bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

- 5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
Corynebacterium melassecola ATCC17965  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 10 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709  
Brevibacterium flavum FERM-P 1708  
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463  
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und  
Corynebacterium glutamicum DSM5715  
Corynebacterium glutamicum DM58-1  
15 Corynebacterium glutamicum DSM12866.

und daraus hergestellte L-Threonin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 20 Corynebacterium glutamicum ATCC21649  
Brevibacterium flavum BB69  
Brevibacterium flavum DSM5399  
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269  
Brevibacterium lactofermentum TBB-10

und daraus hergestellte L-Isoleucin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 25 Corynebacterium glutamicum ATCC 14309  
Corynebacterium glutamicum ATCC 14310  
Corynebacterium glutamicum ATCC 14311  
Corynebacterium glutamicum ATCC 15168  
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871

- 30 und daraus hergestellte L-Tryptophan produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise



Corynebacterium glutamicum ATCC21850 und  
Corynebacterium glutamicum KY9218 (pKW9901)

Den Erfindern gelang es, das neue, für die Transaldolase  
(EC 2.2.1.2) kodierende tal-Gen von C. glutamicum zu  
5 isolieren.

Zur Isolierung des tal-Gens oder auch anderer Gene von C.  
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses  
Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von  
Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und  
10 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das  
Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in  
die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland,  
1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular  
Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory  
15 Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die  
des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell  
50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et  
al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996)  
beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die  
20 mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987,  
Proceedings of the National Academy of Sciences USA,  
84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,  
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.  
Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326  
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum  
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und  
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning  
and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid  
Biosynthetic Genes from Corynebacterium glutamicum. Ph.D.  
30 Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997)  
beschreibt die Klonierung von C. glutamicum Genen unter  
Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research,  
16: 7583) beschriebenen  $\lambda$  Zap Expressionssysteme. Zur  
Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli  
35 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,

5

15

30

In SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des Tal-Genproduktes dargestellt.

Eine auf die oben beschriebene Art und Weise hergestellte Genbank kann weiterhin durch Hybridisierung mit  
5 Nukleotidsonden bekannter Sequenz wie beispielsweise des zwf-Gens (JP-A-09224661) untersucht werden. Die klonierte DNA der Klone, die eine positive Reaktion bei der Hybridisierung zeigen, wird wiederum sequenziert und man erhält zum einen die bekannte Nukleotidsequenz der  
10 eingesetzten Sonde und zum anderen die benachbart liegenden neuen DNA-Sequenzen.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind  
15 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in  
20 Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen  
25 oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology  
30 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit oder SEQ ID  
35 NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren,

5

10

20

25

30

35

unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße tal-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Ein Beispiel für einen Plasmidvektor mit dessen Hilfe das Verfahren Amplifikation durch Integration durchgeführt werden kann ist pSUZ1, der in Figur 1 dargestellt ist. Plasmid pSUZ1 besteht aus dem von Spratt et al. (Gene 41:

337-342(1986))beschriebenem E. coli Vektor pBGS8 in den das tal-Gen eingebaut wurde.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben dem tal-Gen eines oder mehrere  
5 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphatweges oder des Aminosäure-Exports zu verstärken oder zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung L-Aminosäuren, insbesondere von L-Lysin, gleichzeitig eines oder mehrere  
10 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335),
- das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende lysC-Gen (Kalinowski et al. (1990), Molecular  
15 and General Genetics 224: 317-324),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-  
20 198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession  
25 number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),
- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende  
30 zwf-Gen (JP-A-9-224661),

- das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- 5 • das devB-Gen,
- das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden.

10 So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Threonin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende 15 hom<sup>dr</sup>-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 20 • das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mgo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 25 • das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),



- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende zwf-Gen (JP-A-9-224661),
- 5 ◦ das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen (DE 199 41 478.5; DSM 12840),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- das devB-Gen,
- 10 ◦ das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden..

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des tal-Gens gleichzeitig

- 15 ◦ das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen (DE 199 50 409.1 DSM 13047) und/oder
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478, DSM 12969), oder
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen
- 20 (DE 199 51 975.7; DSM 13114), oder
- das zwa2-Gen (DE: 199 59 327.2; DSM 13113)

abzuschwächen.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des tal-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:
- 25 "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in:

Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder

00228 990228 BT

die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle  
5 Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise  
10 während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur  
15 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen  
20 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-  
25 Aminosäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et  
30 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* JM109/pSUZ1 als DSM 13263.

In SEQ ID NO 1 ist ebenfalls das neue devB-Gen enthalten. Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pSUZ1

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

- |    |          |   |
|----|----------|---|
| 5  | lacZ:    | segments of lacZ $\alpha$ gene fragment |
|    | kan r:   | kanamycin resistance                    |
|    | tal:     | transaldolase gene                      |
|    | ori:     | origin of replication of plasmid pBGS8  |
|    | BclI:    | cut site of restriction enzyme BclI     |
| 10 | EcoRI:   | cut site of restriction enzyme EcoRI    |
|    | HindIII: | cut site of restriction enzyme HindIII  |
|    | PstI:    | cut site of restriction enzyme PstI     |
|    | SacI:    | cut site of restriction enzyme SacI     |

0002280" 9902280" 9902280"

## Examples

The following examples will further illustrate this invention. The molecular biology techniques, e.g. plasmid DNA isolation, restriction enzyme treatment, ligations, standard transformations of *Escherichia coli* etc. used are, (unless stated otherwise), described by Sambrook et al., (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories, USA).

## 10 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der

Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 270870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

## Isolierung und Sequenzierung des tal-Gens

20 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem  
Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-  
25 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit  
shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular  
Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung  
SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach  
gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung  
30 der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp  
mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021,  
Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors  
pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen,  
Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning

- Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den
- 5 Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde
- 10 anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert.
- 15 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467)
- 20 mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und
- 25 Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).
- 30 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero-1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
- 35 Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

990228 BT



Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3 dargestellt.

### Example 3

#### 10 Cloning of the tal gene

PCR was used to amplify DNA fragments containing the entire tal gene of *C. glutamicum* 13032 and flanking upstream and downstream regions. PCR reactions were carried out using oligonucleotide primers designed from the sequence as determined in examples 1 and 2. Genomic DNA was isolated from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 according to Heery and Dunican (Applied and Environmental Microbiology 59: 791-799 (1993)) and used as template. The tal primers used were:

20 fwd. primer: 5' GGT ACA AAG GGT CTT AAG 3'C  
rev. primer: 5' GAT TTC ATG TCG CCG TTA 3'

PCR Parameters were as follows:

35 cycles  
95°C for 3 minutes  
25 94°C for 1 minute  
47°C for 1 minute  
72°C for 45 seconds  
2.0 mM MgCl<sub>2</sub>  
approximately 150-200 ng DNA template.

30 The PCR product obtained was cloned into the commercially available pGEM-T vector purchased from Promega Corp. (pGEM-

T Easy Vector System 1, cat. no. A1360, Promega UK, Southampton, UK) using strain E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., Gene, 33: 103-119 (1985)) as a host. The entire tal gene was subsequently isolated from the pGEM T-vector on an  
5 Eco RI fragment and cloned into the lacZ $\alpha$  EcoRI site of the E. coli vector pBGS8 (Spratt et al., Gene 41(2-3): 337-342 (1986)). The restriction enzymes used were obtained from Boehringer Mannheim UK Ltd. (Bell Lane, Lewes East Sussex BN7 1LG, UK) and used according to manufacturers  
10 instructions. E. coli JM109 was then transformed with this ligation mixture and electrotransformants were selected on Luria agar supplemented with isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside (XGAL) and kanamycin at concentrations of  
15 1mM, 0.02% and 50 mg/l respectively. Plates were incubated for twelve hours at 37°C. Plasmid DNA was isolated from one transformant, characterised by restriction enzyme analysis using Eco RI. This new construct was designated pSUZ 1.

990228 BT

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> National University of Ireland, Galway  
Degussa-Hüls AG

5

<120> Neue für das tal Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990228BT

10

<140>

<141>

<160> 4

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6995

<212> DNA

20

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (2471)..(3550)

25

<223> tal-Gen

<400> 1

cacatttgaa ccacagttgg ttataaaatg ggttcaacat cactatgggt agaggtgttg 60

30

acgggtcaga ttaagcaaag actactttcg gggtagatca cctttgccaa atttgaacca 120

attaacctaa gtcgtagatc tgatcatcgg atctaacgaa aacgaaccaa aactttgggtc 180

35

cgggtttaac ccaggaagga ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca 240

ctgtacgcaa ttaccctctc gattgggtcg atgtggacac caaggctgta gacactgttc 300

gtgtcctcgc tgcagacgct gtagaaaact gtgggtccgg ccaccagggc accgcaatga 360

40

gcctggctcc ccttgcatc accttgtacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca 420

ccaactgggc aggccgtgac cgcttcgttc tttcttgttg ccaactcctc ttgaccaggt 480

45

acatccagct ttacttgggt ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca 540

cctgggattc cttgaccca ggacacctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca 600

ccactggccc tcttgccag ggtcttgcat ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc 660

50

gtgagcgtgg cctattcgac ccaaccgtg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca 720

tctacgtcat tgcttctgat ggtgacctgc aggaagggtg cacctctgag gcactctcca 780

55

tcgctggcac ccagcagctg ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcactctca 840

tcgaagacaa cactgagatc gctttcaacg aggacgttgt tgctcgttac aaggcttacg 900

gctggcagac cattgaggtt gaggctggcg aggacgttgc agcaatcgaa gctgcagttg 960

990228 BT

Sub  
BI

	ctgagggctaa	gaaggacacc	aagcgaccta	ccttcacccg	cggttcgcacc	atcatcggtt	1020	
	tcccagctcc	aactatgatg	aacaccgggtg	ctgtgcacgg	tgctgctctt	ggcgcagctg	1080	
5	aggttgcagc	aaccaagact	gagcttggat	tcgatcctga	ggctcacttc	gcgatcgacg	1140	
	atgaggttat	cgctcacacc	cgctccctcg	cagagcgcgc	tgcacagaag	aaggctgcat	1200	
10	ggcaggtcaa	gttcgatgag	tgggcagctg	ccaaccctga	gaacaaggct	ctgttcgatc	1260	
	gcctgaactc	ccgtgagctt	ccagcgggct	acgtgacga	gctcccaaca	tgggatgcag	1320	
	atgagaaggg	cgtcgcaact	cgtaaggctt	ccgagggtgc	acttcaggca	ctgggcaaga	1380	
15	cccttcctga	gctgtggggc	ggttcgctg	acctcgcagg	ttccaacaac	accgtgatca	1440	
	agggctcccc	ttccttcggc	cctgagtcca	tctccaccga	gacctggtct	gctgagcctt	1500	
	acggccgtaa	cctgcacttc	ggtatccgtg	agcacgctat	gggatccatc	ctcaacggca	1560	
20	tttccctcca	cggtggcacc	cgcccatacg	gcggaacctt	cctcatcttc	tccgactaca	1620	
	tgcgctctgc	agttcgtctt	gcagctctca	tggagaccga	cgcttactac	gtctggaccc	1680	
25	acgactccat	cggtctgggc	gaagatggcc	caaccaccca	gcctgttgaa	accttggctg	1740	
	cactgcgcgc	catcccaggt	ctgtccgtcc	tgcgctctgc	agatgcgaac	gagaccgccc	1800	
	aggcttgggc	tgcagcactt	gagtacaagg	aaggccctaa	gggtcttgca	ctgaccgccc	1860	
30	agaacgttcc	tgttctggaa	ggcaccaagg	agaaggctgc	tgaaggcggt	cgccgcgggtg	1920	
	gctacgtcct	ggttgagggg	tccaaggaaa	ccccagatgt	gacccctcatg	ggctccggct	1980	
35	ccgaggttca	gcttgcagtt	aacgctgcga	aggctctgga	agctgagggc	gttgcagctc	2040	
	gcgttgtttc	cgttccttgc	atggattggg	tccaggagca	ggacgcagag	tacatcgagt	2100	
	ccgttctgcc	tgcagctgtg	accgctcgtg	tgtctgttga	agctggcatc	gcaatgcctt	2160	
40	ggtaccgctt	cttgggcacc	cagggccgtg	ctgtctccct	tgagcacttc	ggtgcttctg	2220	
	cggattacca	gaccctgttt	gagaagttcg	gcacaccac	cgatgcagtc	gtggcagcgg	2280	
45	ccaaggactc	cattaacggg	taattgccct	gctgttttta	gcttcaaccc	ggggcaatat	2340	
	gattctccgg	aattttattg	ccccggggtg	ttgttggtta	tcggtacaaa	gggtcttaag	2400	
	cacatccctt	acttgctgc	tctccttgag	cacagttcaa	gaacaattct	tttaaggaaa	2460	
50	atttagtttc	atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc						2509
		Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser						
		1	5	10				
55	act tgg ctc gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc						2557	
	Thr Trp Leu Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu							
	15	20	25					

	agc	cag	gtt	att	gag	gaa	aag	tct	gta	gtc	ggt	gtc	acc	acc	aac	cca	2605
	Ser	Gln	Val	Ile	Glu	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	
	30					35					40					45	
5	gct	att	ttc	gca	gca	gca	atg	tcc	aag	ggc	gat	tcc	tac	gac	gct	cag	2653
	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ala	Gln	
					50					55					60		
10	atc	gca	gag	ctc	aag	gcc	gct	ggc	gca	tct	gtt	gac	cag	gct	gtt	tac	2701
	Ile	Ala	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Gln	Ala	Val	Tyr	
				65				70					75				
15	gcc	atg	agc	atc	gac	gac	gtt	cgc	aat	gct	tgt	gat	ctg	ttc	acc	ggc	2749
	Ala	Met	Ser	Ile	Asp	Asp	Val	Arg	Asn	Ala	Cys	Asp	Leu	Phe	Thr	Gly	
			80					85					90				
20	atc	ttc	gag	tcc	tcc	aac	ggc	tac	gac	ggc	cgc	gtg	tcc	atc	gag	gtt	2797
	Ile	Phe	Glu	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Ile	Glu	Val	
		95					100					105					
25	gac	cca	cgt	atc	tct	gct	gac	cgc	gac	gca	acc	ctg	gct	cag	gcc	aag	2845
	Asp	Pro	Arg	Ile	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	
	110					115					120					125	
30	gag	ctg	tgg	gca	aag	gtt	gat	cgt	cca	aac	gtc	atg	atc	aag	atc	cct	2893
	Glu	Leu	Trp	Ala	Lys	Val	Asp	Arg	Pro	Asn	Val	Met	Ile	Lys	Ile	Pro	
					130					135					140		
35	gca	acc	cca	ggt	tct	ttg	cca	gca	atc	acc	gac	gct	ttg	gct	gag	ggc	2941
	Ala	Thr	Pro	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	
				145				150						155			
40	atc	agc	gtt	aac	gtc	acc	ttg	atc	ttc	tcc	gtt	gct	cgc	tac	cgc	gag	2989
	Ile	Ser	Val	Asn	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Ser	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Glu	
			160					165					170				
45	gtc	atc	gct	gcg	ttc	atc	gag	ggc	atc	aag	cag	gct	gct	gca	aac	ggc	3037
	Val	Ile	Ala	Ala	Phe	Ile	Glu	Gly	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	Gly	
		175					180					185					
50	cac	gac	gtc	tcc	aag	atc	cac	tct	gtg	gct	tcc	ttc	ttc	gtc	tcc	cgc	3085
	His	Asp	Val	Ser	Lys	Ile	His	Ser	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Val	Ser	Arg	
	190					195					200					205	
55	gtc	gac	gtt	gag	atc	gac	aag	cgc	ctc	gag	gca	atc	gga	tcc	gat	gag	3133
	Val	Asp	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Gly	Ser	Asp	Glu	
				210					215						220		
60	gct	ttg	gct	ctg	cgc	ggc	aag	gca	ggc	gtt	gcc	aac	gct	c			

gcg tac gct gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc 3325  
 Ala Tyr Ala Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr  
 270 275 280 285  
 5 gtc aac acc atg cca gaa ggc acc atc gac gcg gtt ctg gag cag ggc 3373  
 Val Asn Thr Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly  
 290 295 300  
 10 aac ctg cac ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct 3421  
 Asn Leu His Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala  
 305 310 315  
 15 gtg ttc tcc cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc 3469  
 Val Phe Ser Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe  
 320 325 330  
 20 cag gtc ctg gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc 3517  
 Gln Val Leu Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser  
 335 340 345  
 gaa ctg ctt gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tagaatcagc acgctgcatc 3570  
 Glu Leu Leu Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys  
 350 355 360  
 25 agtaacggcg acatgaaatc gaattagttc gatcttatgt ggccggttaca catctttcat 3630  
 taaagaaagg atcgtgacac taccatcgtg agcacaaca cgacccccctc cagctggaca 3690  
 30 aaccactgc gcgacccgca ggataaacga ctcccccgca tcgctggccc ttccggcatg 3750  
 gtgatcttcg gtgtcactgg cgacttggct cgaaagaagc tgctccccgc catttatgat 3810  
 ctagcaaacc gcggattgct gccccagga ttctcgttgg taggttaagg ccgcccgcgaa 3870  
 35 tgggtccaaag aagactttga aaaatacgta cgcgatgccg caagtgctgg tgctcgtacg 3930  
 gaattccgtg aaaatgtttg ggagcgctc gccgagggtg tggaatttgt tcgcggaac 3990  
 40 tttgatgatg atgcagcttt cgacaacctc gctgcaacac tcaagcgcac cgacaaaacc 4050  
 cgcggcaccg ccggcaactg ggcttactac ctgtccattc caccagattc cttcacagcg 4110  
 gtctgccacc agctggagcg ttccggcatg gctgaatcca ccgaagaagc atggcgccgc 4170  
 45 gtgatcatcg agaagccttt cggccacaac ctggaatccg cacacgagct caaccagctg 4230  
 gtcaacgcag tcttcccaga atcttctgtg ttccgcacg accactatctt gggcaaggaa 4290  
 50 acagttcaaa acatcctggc tctgcgtttt gctaaccagc tgtttgagcc actgtggaac 4350  
 tccaactacg ttgaccacgt ccagatcacc atggctgaag atattggctt ggggtggacgt 4410  
 gctggttact acgacggcat cggcgagcc cgcgacgtca tccagaacca cctgatccag 4470  
 55 ctcttggtc tggttgccat ggaagaacca atttcttctg tgccagcgca gctgcaggca 4530  
 gaaaagatca aggtgctctc tgcgacaaag ccgtgctacc cattggataa aacctccgct 4590

3325  
 3373  
 3421  
 3469  
 3517  
 3570  
 3630  
 3690  
 3750  
 3810  
 3870  
 3930  
 3990  
 4050  
 4110  
 4170  
 4230  
 4290  
 4350  
 4410  
 4470  
 4530  
 4590

cgtggtcagt acgctgccgg ttggcagggc tctgagttag tcaagggact tcgcaagaa 4650  
 gatggcttca accctgagtc caccactgag acttttgccg cttgtacctt agagatcacg 4710  
 5 tctcgctcgt gggctgggtg gccgttctac ctgcgcaccg gtaagcgtct tggtcgccgt 4770  
 gttactgaga ttgccgtggt gtttaaagac gcaccacacc agcctttcga cggcgacatg 4830  
 10 actgtatccc ttggccaaaa cgccatcgtg attcgcgtgc agcctgatga aggtgtgctc 4890  
 atccgcttcg gttccaaggt tccaggttct gccatggaag tccgtgacgt caacatggac 4950  
 ttctctact cagaatcctt cactgaagaa tcacctgaag catacgagcg cctcattttg 5010  
 15 gatgcgctgt tagatgaatc cagcctcttc cctaccaacg aggaagtgga actgagctgg 5070  
 aagattcttg atccaattct tgaagcatgg gatgccgatg gagaaccaga ggattaccca 5130  
 20 gcgggtacgt ggggtccaaa gagcgtgat gaaatgcttt cccgcaacgg tcacacctgg 5190  
 cgcaggccat aatttagggg caaaaaatga tctttgaact tccggatacc accaccagc 5250  
 aaatttccaa gaccctaact cgactgcgtg aatcgggcac ccaggtcacc accggccgag 5310  
 25 tgctcacct catcgtggtc actgactccg aaagcgatgt cgctgcagtt accgagtcca 5370  
 ccaatgaagc ctgcgcgag caccatctc gcgtgatcat tttggtgggt ggcgataaaa 5430  
 ctgcagaaaa caaagttgac gcagaagtcc gtatcggtgg cgacgtgggt gcttccgaga 5490  
 30 tgatcatcat gcatctcaac ggacctgtcg ctgacaagct ccagtatgtc gtcacaccac 5550  
 tgttgcttcc tgacaccccc atcgttgctt ggtggccagg tgaatcacca aagaatcctt 5610  
 35 cccaggaccc aattggacgc atcgcacaa gacgcatac tgatgctttg tacgaccgtg 5670  
 atgacgcact agaagatcgt gttgagaact atcaccagg tgataccgac atgacgtggg 5730  
 cgcgccttac ccagtggcgg ggacttggtg cctcctcatt ggatcaccca ccacacagcg 5790  
 40 aatcacttc cgtgaggctg accggtgcaa gcggcagtac ctcggtggat ttggctgcag 5850  
 gctggttggc gcggaggctg aaagtgcctg tgatccgca ggtgacagat gctcccaccg 5910  
 45 tgccaaccga tgagtttggt actccactgc tggctatcca gcgcctggag atcgttcgca 5970  
 ccaccggctc gatcatcatc accatctatg acgctcatal ccttcaggta gagatgccgg 6030  
 aatccggcaa tgccccatcg ctggtggcta ttggtcgtcg aagtgagtc gactgcttgt 6090  
 50 ctgaggagct tcgccacatg gatccagatt tgggctacca gcacgacta tccggcttgt 6150  
 ccagcgtcaa gctggaaacc gtctaaggag aaatacaaca ctatggttga tgtagtacgc 6210  
 55 gcacgcgata ctgaagattt gggtgcacag gctgcctcca aattcattga gggtgttgaa 6270  
 gcagcaactg ccaataatgg caccgcacag gtagtgctca ccggtgggtg gcccgccatc 6330  
 aagttgctgg aaaagctcag cgttgatgcg gctgaccttg cctgggatcg cattcatgtg 6390

990228 BT  
 30

ttcttcggcg atgagcgcaa tgtccctgtc agtgattctg agtccaatga gggccaggct 6450  
5 cgtgaggcac tgttgtccaa ggtttctatc cctgaagcca acattcacgg atatggtctc 6510  
ggcgacgtag atcttgcaga ggcagcccg cgttacgaag ctgtggttga tgaattcgca 6570  
ccaaacggct ttgatcttca cctgctcggc atgggtggcg aaggccatat caactccctg 6630  
10 ttccctcaca ccgatgcagt caaggaatcc tccgcaaagg tcatcgcggt gtttgattcc 6690  
cctaagcctc cttcagagcg tgcaactcta acccttctctg cggttcactc cgcaaagcgc 6750  
gtgtggttgc tggtttcttg tgcggagaag gctgaggcag ctgcggcgat cgtcaacggg 6810  
15 gagcctgctg ttgagtggcc tgctgctgga gctaccggat ctgaggaaac ggtattgttc 6870  
ttggctgatg atgctgcagg aaatctctaa gcagcgccag ctctaacaag aagctttaac 6930  
20 aagaagctct aacgaaaagc actaacaac taatccgggt gcgaaccttc atctgaatcg 6990  
atgga 6995

25 <210> 2  
<211> 360  
<212> PRT  
<213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <400> 2  
Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu  
1 5 10 15  
35 Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val  
20 25 30  
Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe  
35 40 45  
40 Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu  
50 55 60  
Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser  
45 65 70 75 80  
Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu  
85 90 95  
50 Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg  
100 105 110  
Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp  
115 120 125  
55 Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro  
130 135 140  
Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val  
145 150 155 160



	Asn	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Ser	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Glu	Val	Ile	Ala	
					165												175
5	Ala	Phe	Ile	Glu	Gly	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	Gly	His	Asp	Val	
				180				185						190			
	Ser	Lys	Ile	His	Ser	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Val	Ser	Arg	Val	Asp	Val	
			195					200					205				
10	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Gly	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	
		210					215					220					
	Leu	Arg	Gly	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Val	
15		225				230					235					240	
	Tyr	Lys	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	
					245					250					255		
20	Gln	Arg	Pro	Leu	Trp	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ala	
				260					265					270			
	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Gly	Pro	Asn	Thr	Val	Asn	Thr	
			275					280					285				
25	Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Glu	Gln	Gly	Asn	Leu	His	
		290					295					300					
	Gly	Asp	Thr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Phe	Ser	
30		305				310					315					320	
	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Asp	Val	Phe	Gln	Val	Leu	
					325					330					335		
35	Glu	Thr	Glu	Gly	Val	Asp	Lys	Phe	Val	Ala	Ser	Trp	Ser	Glu	Leu	Leu	
				340					345					350			
	Glu	Ser	Met	Glu	Ala	Arg	Leu	Lys									
			355					360									
40																	
	<210>	3															
	<211>	1083															
45	<212>	DNA															
	<213>	Corynebacterium glutamicum															
	<220>																
	<221>	CDS															
50	<222>	(1)..(1080)															
	<223>	tal															
	<400>	3															
	atg	tct	cac	att	gat	gat	ctt	gca	cag	ctc	ggc	act	tcc	act	tgg	ctc	48
55	Met	Ser	His	Ile	Asp	Asp	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Thr	Ser	Thr	Trp	Leu	
	1				5					10					15		

	gac	gac	ctc	tcc	cgc	gag	cgc	att	act	tcc	ggc	aat	ctc	agc	cag	gtt	96
	Asp	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Val	
				20					25					30			
5	att	gag	gaa	aag	tct	gta	gtc	ggt	gtc	acc	acc	aac	cca	gct	att	ttc	144
	Ile	Glu	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	Ala	Ile	Phe	
			35					40					45				
10	gca	gca	gca	atg	tcc	aag	ggc	gat	tcc	tac	gac	gct	cag	atc	gca	gag	192
	Ala	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	
			50				55					60					
15	ctc	aag	gcc	gct	ggc	gca	tct	gtt	gac	cag	gct	gtt	tac	gcc	atg	agc	240
	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Gln	Ala	Val	Tyr	Ala	Met	Ser	
	65					70					75					80	
20	atc	gac	gac	gtt	cgc	aat	gct	tgt	gat	ctg	ttc	acc	ggc	atc	ttc	gag	288
	Ile	Asp	Asp	Val	Arg	Asn	Ala	Cys	Asp	Leu	Phe	Thr	Gly	Ile	Phe	Glu	
					85					90					95		
	tcc	tcc	aac	ggc	tac	gac	ggc	cgc	gtg	tcc	atc	gag	gtt	gac	cca	cgt	336
	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Ile	Glu	Val	Asp	Pro	Arg	
				100				105					110				
25	atc	tct	gct	gac	cgc	gac	gca	acc	ctg	gct	cag	gcc	aag	gag	ctg	tgg	384
	Ile	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	Leu	Trp	
			115					120					125				
30	gca	aag	gtt	gat	cgt	cca	aac	gtc	atg	atc	aag	atc	cct	gca	acc	cca	432
	Ala	Lys	Val	Asp	Arg	Pro	Asn	Val	Met	Ile	Lys	Ile	Pro	Ala	Thr	Pro	
			130				135					140					
35	ggt	tct	ttg	cca	gca	atc	acc	gac	gct	ttg	gct	gag	ggc	atc	agc	gtt	480
	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Ser	Val	
	145					150					155					160	
40	aac	gtc	acc	ttg	atc	ttc	tcc	gtt	gct	cgc	tac	cgc	gag	gtc	atc	gct	528
	Asn	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Ser	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Glu	Val	Ile	Ala	
					165					170					175		
	gcg	ttc	atc	gag	ggc	atc	aag	cag	gct	gct	gca	aac	ggc	cac	gac	gtc	576
	Ala	Phe	Ile	Glu	Gly	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	Gly	His	Asp	Val	
				180				185					190				
45	tcc	aag	atc	cac	tct	gtg	gct	tcc	ttc	ttc	gtc	tcc	cgc	gtc	gac	gtt	624
	Ser	Lys	Ile	His	Ser	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Val	Ser	Arg	Val	Asp	Val	
			195				200						205				
50	gag	atc	gac	aag	cgc	ctc	gag	gca	atc	gga	tcc	gat	gag	gct	ttg	gct	

5      cag cgc cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct gcg tac gct 816  
       Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala  
                   260                                   265                                   270

10     gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc gtc aac acc 864  
       Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr  
                   275                                   280                                   285

15     atg cca gaa ggc acc atc gac gcg gtt ctg gag cag ggc aac ctg cac 912  
       Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His  
                   290                                   295                                   300

20     ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct gtg ttc tcc 960  
       Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser  
       305                                   310                                   315                                   320

25     cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc cag gtc ctg 1008  
       Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu  
                   325                                   330                                   335

30     gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc gaa ctg ctt 1056  
       Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu  
                   340                                   345                                   350

35     gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tag 1083  
       Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys  
                   355                                   360

40     <210> 4  
       <211> 360  
       <212> PRT  
       <213> Corynebacterium glutamicum

45     <400> 4  
       Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu  
       1                                   5                                   10                                   15

50     Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val  
                   20                                   25                                   30

55     Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe  
                   35                                   40                                   45

60     Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu  
                   50                                   55                                   60

65     Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser  
                   65                                   70                                   75                                   80

70     Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu  
                   85                                   90                                   95

75     Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg  
                   100                                   105                                   110

80     Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp  
                   115                                   120                                   125

000228 BT 000228 BT 000228 BT



## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterienk,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus  
5 der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
codiert, das die Aminosäuresequenzen von  
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens  
70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von  
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien  
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist, die  
zusätzlich zumindest eine der Nukleotidsequenzen  
enthält, die für die Gene tkt, zwf, opcA und devB  
codieren.
- 25 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,  
enthaltend eine der Nukleinsäuresequenz, wie in  
SEQ ID NO. 3 dargestellt.
- 30 5. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,  
das für ein Polypeptid codiert, das die

Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält.

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend

(i) eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO. 3 dargestellt, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zur den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

7. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen und gegebenenfalls eines oder mehrere der Gene tkt-Gen, zwf-Gen, devB-Gen oder opcA-Gen gleichzeitig verstärkt,
- b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die  
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet  
sind, die die Bildung des der gewünschten L-Aminosäure  
verringern.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8  
bis 12,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die eine der  
Aminosäuren aus der Gruppe L-Lysin, L-Threonin, L-  
Isoleucin oder L-Tryptophan herstellen.
12. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, gemäß Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man in den coryneformen Mikroorganismen, die  
insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren,  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende dapA-Gen,
- 12.2 das für eine feed back resistente  
Aspartatkinase kodierende lysC-Gen,
- 12.3 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase  
kodierende pyc-Gen,
- 12.5 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase  
kodierende mqo-Gen,
- 12.6 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,

- 12.7 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase  
kodierende gnd-Gen,
- 12.8 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase  
kodierende zwf-Gen,
- 5 12.9 das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen,
- 12.10 das zwal-Gen,
- 12.11 das für die Enolase kodierende eno-Gen,
- 12.12 das opcA-Gen
- verstärkt bzw. überexprimiert.
- 10 13. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin  
gemäß Anspruch 8,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man in coryneformen Mikroorganismen, die  
insbesondere bereits L-Threonin produzieren,  
15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe
- 13.1 gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase  
kodierende hom-Gen oder das für eine "feed back  
resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende  
20 hom<sup>dr</sup>-Allel,
- 13.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 13.3 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-  
Gen,
- 25 13.4 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase  
kodierende mqo-Gen,
- 13.5 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,



- 13.6 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase  
kodierende gnd-Gen,
- 13.7 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase  
kodierende zwf-Gen,
- 5 13.8 das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen,
- 13.9 das zwal-Gen,
- 13.10 das für die Enolase kodierende eno-Gen,
- 13.11 das opcA-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 10 14. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man für die Herstellung von L-Aminosäuren,  
insbesondere von L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin oder  
L-Tryptophan Bakterien fermentiert, in denen man
- 15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe,
- 14.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
codierende pck-Gen
- 14.2 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase  
20 codierende pgi-Gen
- 14.3 das für die Pyruvat-Oxidase codierende poxB-Gen  
oder
- 14.4 das zwa2-Gen
- abschwächt.
- 25 15. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1  
als Hybridisierungssonden zur Isolation von cDNA, die  
für das tal-Genprodukt codiert.

16. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1 als Hybridisierungssonden zur Isolierung von cDNA oder Genen, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des tal-Gens aufweisen.

[illegible]

## Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen

### Zusammenfassung

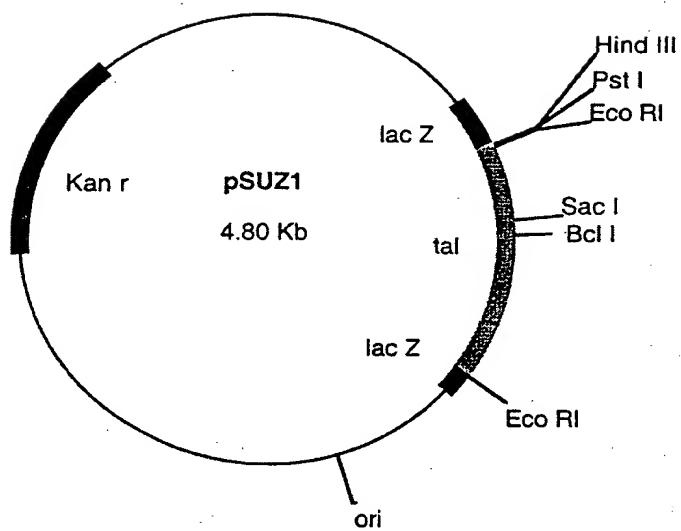
Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterienk, enthaltend eine

- 5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
  - 15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c)

und ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,  
20 das dadurch gekennzeichnet ist, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen verstärkt,
- 25 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figure 1:

WS  
3/5/03

00331260 032000